

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年3月6日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/018564 A1

(51) 国際特許分類: C07D 263/58, A61K 31/496,
A61P 3/06, 9/10, 43/00, C07C 233/25

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08343

(22) 国際出願日: 2002年8月19日 (19.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-251099 2001年8月22日 (22.08.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 興和株式会社 (KOWA COMPANY, LTD) [JP/JP]; 〒460-8625
愛知県名古屋市中区錦三丁目6番29号 Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渋谷 公幸
(SHIBUYA, Kimiyuki) [JP/JP]; 〒359-1142 埼玉県
所沢市大字上新井729番地の1 ライオンズ
ヒルズ西所沢403号 Saitama (JP). 川峯 勝巳

(KAWAMINE, Katsumi) [JP/JP]; 〒359-1145 埼玉県所
沢市大字山口27-2 ルーインズガーデン305
Saitama (JP). 扇谷 忠明 (OOGIYA, Tadaaki) [JP/JP];
〒359-1143 埼玉県所沢市宮本町2-23-36 グ
ラン・コート航空公園408 Saitama (JP). 北村
崇博 (KITAMURA, Takahiro) [JP/JP]; 〒189-0001 東京
都東村山市秋津町1-25-7 Tokyo (JP). 三
浦 徹 (MIURA, Toru) [JP/JP]; 〒189-0022 東京都東
村山市野口町2-17-43 興和東村山荘408
Tokyo (JP). 枝野 敏行 (EDANO, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒
350-0034 埼玉県川越市仙波町1丁目3-15 Saitama
(JP). 吉中 康展 (YOSHINAKA, Yasunobu) [JP/JP]; 〒
358-0024 埼玉県入間市久保稲荷1-12-3 扇
町屋団地10-104 Saitama (JP). 山田 洋一 (YA-
MADA, Youichi) [JP/JP]; 〒359-0038 埼玉県所沢市北
秋津18-1 新井荘101 Saitama (JP).

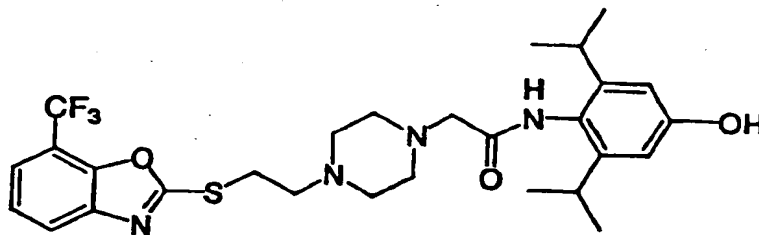
(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

[続葉有]

(54) Title: VASCULAR WALL-SELECTIVE ACAT INHIBITOR

(54) 発明の名称: 血管壁選択的なACAT阻害剤



(57) Abstract: It is intended to provide a novel compound, which sustains an ACAT inhibitory activity and a macrophage-selectivity to a certain degree as a practically usable drug and can maintain an excellent oral absorbability and a favorable drug concentration in case of tested *in vivo*; a process for producing the same; medicinal compositions comprising the same and its intermediate. Namely, 2-[4-[2[(7-trifluoromethylbenzoxazol-2-ylthio)ethyl]piperidin-1-yl]-N-(2,6-diisopropyl-4-hydroxyphenyl)acetamide represented by the following formula: salts thereof or solvates of the same; and medicinal compositions comprising the compound represented by the above formula, salts thereof or solvates of the same together with pharmaceutically acceptable carriers.

[続葉有]



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

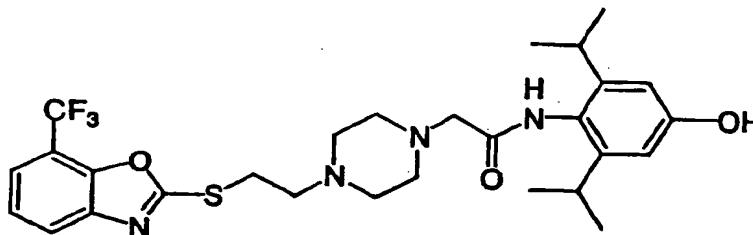
(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、実際の医薬品として、ACAT阻害活性及びマクロファージ選択性がある程度維持し、かつ、経口吸収性及び生体内試験における薬物濃度の保持が優れた新規な化合物、その製造方法、及びそれを用いた医薬組成物、並びにその中間体を提供するものである。

本発明は、次式



で表される 2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド、これらの塩又はこれらの溶媒和物、並びに、前記式で表される化合物、この塩又はこの溶媒和物及び薬学的に許容される担体とからなる医薬組成物に関する。

明 細 書

血管壁選択的なA C A T阻害剤

技術分野

本発明は、医薬として、具体的にはアシル コエンザイム A コレステロール アシルトランスフェラーゼ (A C A T) 阻害剤として、より具体的には高脂血症、各種動脈硬化症の予防・治療・改善剤として、各種動脈硬化症としてさらに具体的には冠動脈硬化疾患の予防・治療・改善剤である有用な新規化合物、その製造方法、及びそれを用いた医薬組成物、ならびにその中間体に関する。

背景技術

近年、生活水準の向上に基づく高カロリー、高コレステロール食を含む欧米型食生活への変化ならびに人口の高齢化に伴い、高脂血症およびこれに起因する動脈硬化性疾患が急増してきており、これが一つの社会問題を呈している。これまでの高脂血症および動脈硬化症の薬物療法は主として原因となる血中の脂質を低下させることに重点が置かれており、動脈硬化病巣そのものを標的として治療するものではなかった。アシル コエンザイム A : コレステロール アシルトランスフェラーゼ (A C A T) はコレステロールからコレステロールエステルへの合成を触媒する酵素であり、コレステロールの代謝と消化管での吸収に重要な役割を果たすものである。小腸上皮細胞において遊離コレステロールのエステル化を行うA C A T酵素を阻害することは腸管からのコレステロールの吸収を阻害し、また、肝臓においてはA C A T阻害に基づくコレステロールエステルの生成阻害が肝臓から血中への超低比重リポ蛋白質 (V L D L) の分泌を抑制し、これらの結果により血中コレステロールの低下作用へとつながると考えられる。

これまでのA C A T阻害剤の多くはこれら小腸、肝臓のA C A T酵素に作用し、抗高脂血症剤として血中コレステロールの低下作用を期待するものであった。例えば、米国特許第4716175号の明細書には2, 2-ジメチル-N-(2, 4, 6-トリメトキシフェニル) ドデカンアミドが、欧州特許第372445号

には N' - (2, 4-ジフルオロフェニル) - N - [5 - (4, 5-ジフェニル-1H-イミダゾール-2-イルチオ)ペンチル] - N-ヘプチルウレアなどがACAT阻害剤として記載されている。

しかしながら、これまでの多くのACAT阻害剤は抗高脂血症剤として血中コレステロールの低下作用に重点を置き、その作用発現のための大量投与から臨床試験の段階で腸管出血、腸管障害、下痢や肝障害などの副作用が多発し、臨床開発を困難にしてきている。

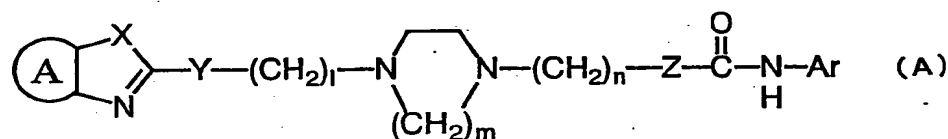
さらに、この他にWO 92/09582号にはイミダゾールの2位が置換された化合物：5 - [2 - [2 - (4-フルオロフェニル)エチル] - 3 - (1-メチル-1H-イミダゾール-2-イル) - 2H-ベンゾピラン-6-イル]オキシ-2, 2-ジメチル-N - (2, 6-ジイソプロピルフェニル)ペンタンアミドが、欧州特許477778号にはイミダゾールの4, 5位に置換基を有する化合物：N-ブチル-N' - [2 - [3 - (5-エチル-4-フェニルイミダゾール-1-イル)プロボキシ] - 6-メチルフェニル]尿素が開示されている。さらに、N - (2, 6-ジイソプロピルフェニル) - 2 - (テトラデシルチオ)アセトアミド(WO 92/09572号明細書参照)、N - [5 - (4, 5-ジフェニル-1H-イミダゾール-2-イルチオ)ペンチル] - N-ヘプチル-2-ベンゾオキサゾールアミン(WO 93/23392号明細書参照)などの化合物も開示されている。

そもそも動脈硬化症は血管の内膜肥厚と脂質蓄積という特徴的な病変であるが、最近の研究によると動脈硬化病巣の形成に中心的な役割を果たしているマクロファージの泡沫化を抑えることにより動脈硬化病巣そのものの退縮が期待できるとされている。粥状動脈硬化症の病巣にマクロファージ由来の泡沫細胞(コレステロールエステルを脂肪滴として細胞内に貯蔵している。)が観察され、このマクロファージの泡沫化が病変の進展に深く関わっているとされている。また、動脈硬化病変部位の血管壁のACAT活性が亢進しており、血管壁にコレステロールエステルが蓄積していることが報告されている[ギリーズ, P. J. 等, Exp. Mol. Pathol., 44, 329-339 (1986)]。

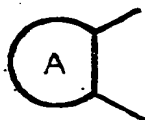
ACAT阻害剤によるコレステロールのエステル化の阻害は細胞内に遊離コレ

ステロールを産みだし、これが高比重リポ蛋白質（HDL）により取り去られ肝臓に運ばれて（HDLによる逆転送）代謝されるので病変部位でのコレステロールエステルの蓄積が抑制されることが期待される [リ, L 等、Biochim. Biophys. Acta. 2001 15, 1530(1):111-22]。この結果、直接的な抗動脈硬化作用が得られるものと考えられる。ACATには小腸に存在するタイプと血管壁に存在するタイプの二つのサブタイプが存在することが報告されている [キヌーネン, P. M.等 Biochemistry 27, 7344-7350 (1988)] が、これまでACAT阻害剤の研究の多くは小腸、肝臓に存在するタイプの酵素を用いて行われていた [トモダ H.等 J. Antibiotics 47, 148-153 (1994)]。

本発明者らは血管壁に存在するタイプのACAT酵素を選択的に阻害する薬剤が、臓器非選択的な阻害剤に比べてより副作用の少ない動脈硬化症などの予防、治療、改善剤に成りうると考えた。そのような阻害剤を目指し鋭意検討を行った結果、本発明者は次式の一般式（A）

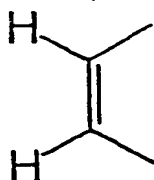


（式中、



は、置換基を有していてもよいベンゼン、ピリジン、シクロヘキサン、又はナフ

タレンの2価残基、又は、基



を示し、

Arは、置換基を有していてもよいアリール基を示し、

Xは、 $-NH-$ 、酸素原子又は硫黄原子を示し、

Yは、 $-NR_1-$ 、酸素原子、硫黄原子、スルホキシド又はスルホンを示し、

Zは、単結合又は $-NR_2-$ を示し、

R_1 は、水素原子、低級アルキル基、置換基を有していてもよいアリール基、又は、置換基を有していてもよいシリル低級アルキル基を示し、

R_2 は、水素原子、低級アルキル基、置換基を有していてもよいアリール基、又は、置換基を有していてもよいシリル低級アルキル基を示し、

lは、0乃至15の整数を示し、

mは、2又は3の整数を示し、

nは、0乃至3の整数を示す。）

で表される化合物、これらの塩又はこれらの溶媒和物が水溶性を有し優れたACAT阻害作用を併せ持つ化合物であることを見出してきた（特願平11-500471号、WO98/54153号参照）。

そして、ACAT阻害作用を持つ化合物について、その薬効だけでなく実際の医薬品候補となるべく条件をさらに追求すると、試験管内（in vitro）試験におけるACAT阻害作用のみが優れているだけでは不十分であり、良好な経口吸収性を示し、かつ、然るべき動脈硬化モデルの動物試験などの生体内試験において、その優れた薬理効果が確認されなければならない。

このような観点から先の発明（特願平11-500471号）における化合物をさらに検討してみると、特願平11-500471号の実施例に具体的に記載

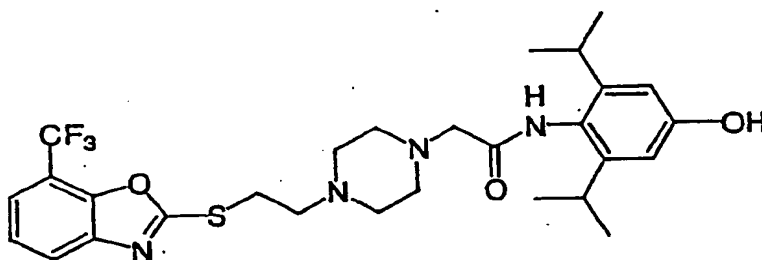
の化合物のなかにはA C A T阻害作用は優れているものの、併せて良好な経口吸収性を示し、かつ、然るべき動脈硬化モデルの動物試験などの生体内試験において十分な薬物濃度を保持することができるという点においては必ずしも十分なものが開示されていなかった。

このように、先の発明（特願平11-500471号）の明細書に具体的に記載された化合物群からA C A T阻害活性及びマクロファージ選択性（又は、血管壁選択性）をある程度維持し、かつ、経口吸収性や生体内試験における薬物濃度の保持などの諸条件を満足する優れた化合物を見出すことはできず、実際の医薬品としてはA C A T阻害活性及びマクロファージ選択性をある程度維持し、かつ、経口吸収性などが優れた化合物の創製が医薬品の条件をより満たすものであり、さらなる開発が望まれていた。

発明の開示

本発明は、実際の医薬品として、A C A T阻害活性及びマクロファージ選択性をある程度維持し、かつ、経口吸収性及び生体内試験における薬物濃度の保持が優れた新規な化合物、その製造方法、及びそれを用いた医薬組成物、並びにその中間体を提供するものである。

本発明は、次式

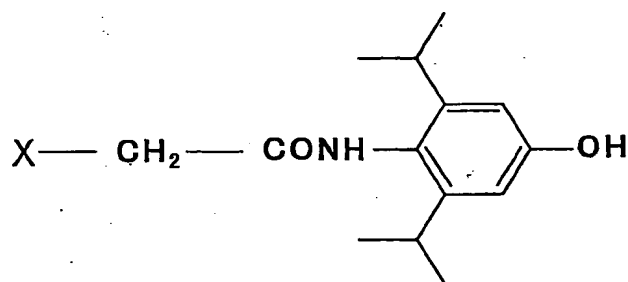


で表される2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド、この塩又はこの溶媒和物、及びその

製造方法に関する。

また、本発明は、前記式で表される化合物、この塩又はこの溶媒和物、及び薬学的に許容される担体とからなる医薬組成物に関する。

さらに本発明は、前記式で表される化合物を製造するための中間体となる次式、



(式中、Xはハロゲン原子を示す。)

で表される化合物、2-ハロ-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド又はその塩に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物の動脈硬化モデル動物試験における脂質沈着面積(白抜き)及び血漿総コレステロール(TC)(黒塗り)における結果を示すグラフである。第1図の縦軸は対照に対する相対比(%)であり、横軸は投与量(mg/kg)をそれぞれ示す。

第2図は、比較化合物CI-1011の動脈硬化モデル動物試験における脂質沈着面積(白抜き)及び血漿総コレステロール(TC)(黒塗り)における結果を示すグラフである。第2図の縦軸は対照に対する相対比(%)であり、横軸は投与量(mg/kg)をそれぞれ示す。

第3図は、比較化合物の特願平11-500471号の実施例-24の化合物の動脈硬化モデル動物試験における脂質沈着面積(白抜き)及び血漿総コレステロール(TC)(黒塗り)における結果を示すグラフである。第3図の縦軸は対照に対する相対比(%)であり、横軸は投与量(mg/kg)をそれぞれ示す。

第4図は、本発明の化合物の動脈硬化モデル動物試験における大動脈脂質沈着の対照に対する相対比（白丸印（○））、血漿総コレステロールの対照に対する相対比（菱形印（◇））、肝臓におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（黒四角印（■））、小腸におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（黒三角印（▲））、副腎におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（バツ印（×））を示すグラフである。第4図の縦軸は対照に対する相対比（％）であり、横軸は投与量（mg/kg）を示す。

第5図は、比較化合物CI-1011の動脈硬化モデル動物試験における大動脈脂質沈着の対照に対する相対比（白丸印（○））、血漿総コレステロールの対照に対する相対比（菱形印（◇））、肝臓におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（黒四角印（■））、小腸におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（黒三角印（▲））、副腎におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（バツ印（×））を示すグラフである。第4図の縦軸は対照に対する相対比（％）であり、横軸は投与量（mg/kg）を示す。

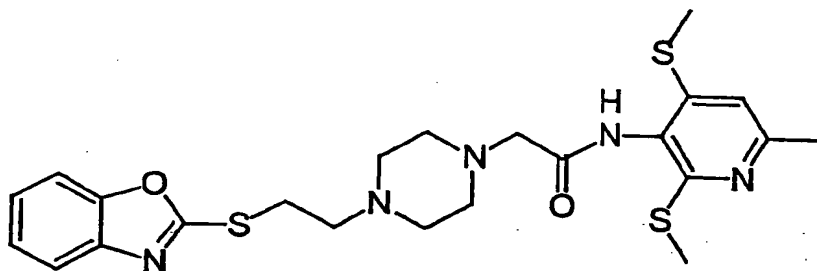
第6図は、比較化合物の特願平11-500471号の実施例-24の化合物の動脈硬化モデル動物試験における大動脈脂質沈着の対照に対する相対比（白丸印（○））、血漿総コレステロールの対照に対する相対比（菱形印（◇））、肝臓におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（黒四角印（■））、小腸におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（黒三角印（▲））、副腎におけるコレステロール・エステル／遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比（バツ印（×））における結果を示すグラフである。第4図の縦軸は対照に対する相対濃度（％）であり、横軸は投与量（mg/kg）を示す。

発明を実施するための最良の形態

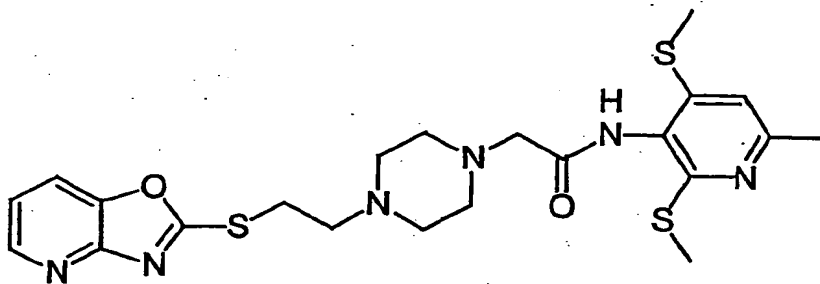
本発明者らは、先に優れたACAT阻害活性及び選択性を有する化合物を提供

してきた（特願平 11-500471 号）。そして、特願平 11-500471 号における実施例に記載の化合物のなかから A C A T 阻害活性の優れている次の 5 つの化合物について A C A T 阻害活性をさらに詳細に検討してみた。

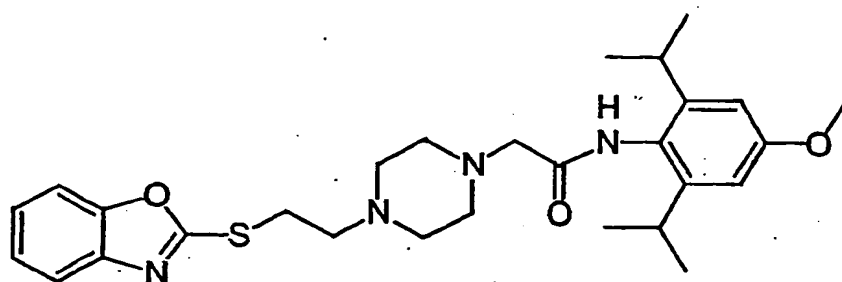
実施例-24 の化合物：N-〔2, 4-ビス（メチルチオ）-6-メチル-3-ピリジル〕-2-〔4-〔2-（ベンゾオキサゾール-2-イルチオ）エチル〕ピペラジン-1-イル〕アセトアミド。



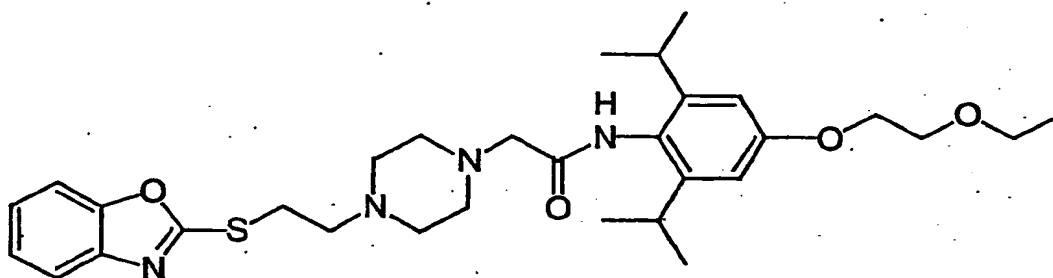
実施例-25 の化合物：N-〔2, 4-ビス（メチルチオ）-6-メチル-3-ピリジル〕-2-〔4-〔2-（オキサゾロ〔4, 5-b〕ピリジン-2-イルチオ）エチル〕ピペラジン-1-イル〕アセトアミド



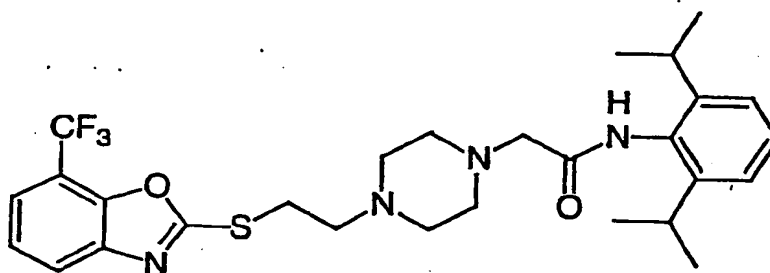
実施例-75 の化合物：2-〔4-〔2-（ベンゾオキサゾール-2-イルチオ）エチル〕ピペラジン-1-イル〕-N-（2, 6-ジイソプロピル-4-メトキシフェニル）アセトアミド



実施例－７８の化合物：２－〔４－〔２－（ベンゾオキサゾール－２－イルチオ）エチル〕ピペラジン－１－イル〕－Ｎ－〔２，６－ジイソプロピル－４－（２－エトキシエチル）オキシフェニル〕アセトアミド



実施例－８５の化合物：２－〔４－〔２－（７－トリフルオロメチルベンゾオキサゾール－２－イルチオ）エチル〕ピペラジン－１－イル〕－Ｎ－（２，６－ジイソプロピルフェニル）アセトアミド



これらの5つの化合物のACAT阻害活性を次の表1に記載する。

表1

試験化合物	J774 : IC ₅₀ (nM)	HepG2 : IC ₅₀ (nM)	比率 : HepG2 / J774
実施例-24	9	60	7
実施例-25	100	9600	96
実施例-75	100	10000	100
実施例-78	14	820	58
実施例-85	19	680	36

実施例-24の化合物は、ACAT阻害活性、特にJ774細胞におけるIC₅₀が9 nMと最も強く好ましいが、マクロファージ選択性 (IC₅₀ (HepG2) / IC₅₀ (J774)) が約7倍と低く、目的とする医薬品の候補化合物として十分なものということとはできなかった。

一方、実施例-25の化合物及び実施例-75の化合物はマクロファージ選択性 (IC₅₀ (HepG2) / IC₅₀ (J774)) が96倍以上という顕著な作用を示すが、他の化合物と比較しJ774細胞における阻害強度が特に優れているとは言い難く、これらの化合物もまた目指す医薬品の候補化合物として十分なものということとはできなかった。

これらの化合物の中でマクロファージ選択性 (IC₅₀ (HepG2) / IC₅₀ (J774)) 及びJ774細胞における阻害強度の両方の程度が実際の医薬品候補としてバランスよく満足している化合物としては、実施例-78及び85の化合物が挙げられる。

これらの実施例-78及び85の化合物について経口吸収性試験を実施したところ、実施例-78の化合物はラット飽食下30 mg / kg 投与時における経口吸収性試験ではC_{max}が14.8 ng / mLで、AUCが29.8 ng · h / mLであり、実施例-85の化合物では、C_{max}が17.6 ng / mL

で、AUCが $71.8 \text{ ng} \cdot \text{hr} / \text{mL}$ であった。この結果をまとめて次の表2に示す。

表 2

試験化合物	投与量	投与媒体	C max	AUC _{0-inf}
実施例-78	30 mg/kg	PEG400 : DMSO 5 : 1	14.8 ng/mL	29.8 ng·hr/mL
実施例-85	30 mg/kg	PEG400	17.6 ng/mL	71.8 ng·hr/mL

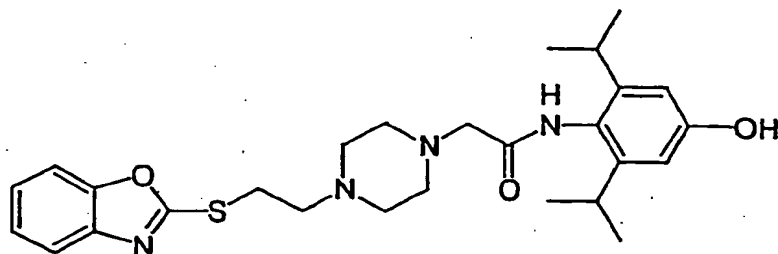
これらの化合物は、ACAT阻害活性及びマクロファージ選択性については充分であるが、その経口吸収性及び薬物血中濃度が低く、生体内において血管壁で優れた薬理効果を持続的に発現させるのに十分な経口吸収性を示すものとしては充分ではなかった。

そこで本発明者らは、実際の医薬品として使用し得るための十分な経口吸収性を示す有効成分をさらに検討するために、優れた細胞系ACAT阻害活性及びマクロファージ選択性を有する実施例-85の化合物に着目した。この化合物とほぼ同等な試験管内試験における細胞系ACAT阻害活性を維持し、かつ、経口吸収性が大幅に改善された化合物が生体内への吸収率を上げ生物学的利用能をさらに高くし、病変部位への直接的な動脈硬化治療を狙えるものと考え、この化合物をリード化合物として各種の誘導体を検討した。

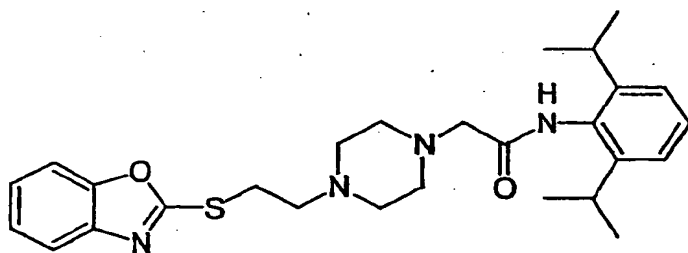
化合物の経口吸収性を改善する方法としては、化合物の水溶性を増加させることが考えられ、このためにリード化合物中に水酸基やカルボキシル基などの極性の比較的大きな親水性の基を導入することが考えられるが、このような極性の大きな基の導入はACAT阻害活性やその選択性に著しい影響を与えるおそれがある。

そこで、まずこの点を特願平11-500471号に具体的に記載されている化合物について検討してみた。特願平11-500471号の実施例-72に記

載されている次式、



で表される化合物である 2-[4-[2-(ベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミドは、実施例-1 に記載されている次式、



で表される化合物である 2-[4-[2-(ベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピルフェニル)アセトアミドのアミド基に結合するフェニル基の 4 位に水酸基が導入された形になっている化合物であり、これらの化合物についてその A C A T 阻害活性及びラットを用いた飽食下の経口吸収性試験（投与量 30 mg / kg）を行った。その結果を次の表 3 及び表 4 に示す。

表 3

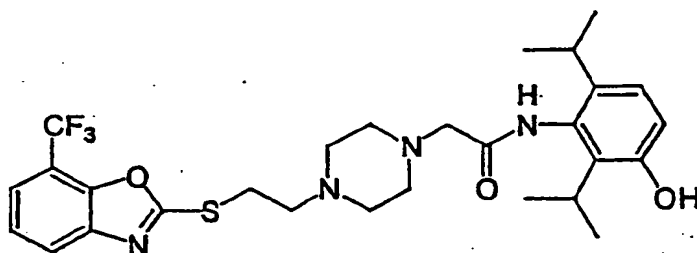
試験化合物	J774 : IC ₅₀ (nM)	HepG2 : IC ₅₀ (nM)	比率 : HepG2 / J774
実施例 - 1	260	680	3
実施例 - 7 2	130	780	7

表 4

試験化合物	投与量	投与媒体	C max	A U C 0-inf
実施例 - 1	30 mg/kg	0.05 N (塩酸水)	110 ng/mL	295 ng · hr/mL
実施例 - 7 2	30 mg/kg	0.05 N (塩酸水)	470 ng/mL	1095 ng · hr/mL

実施例 - 7 2 の化合物の C max は 470 ng/mL、AUC は 1095 ng · hr/mL となり、元の実施例 - 1 の化合物に比べて C max の値では約 4.3 倍の経口吸収性の改善効果があることがわかった (表 4 参照)。そして、これらの化合物では水酸基の導入により、ACAT 阻害活性については著しい変化は見られなかったが (表 3 参照)、これらの化合物はいずれもその絶対値において優れた ACAT 阻害剤ということとはできない。

次に、ACAT 阻害活性及び選択性の優れた実施例 - 8 5 の化合物について水酸基の導入を検討するために、実施例 - 8 5 の化合物のアミド基に結合するフェニル基の 3 位に水酸基を導入した次式、



で表される 2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド(以下、比較化合物という。)では、細胞系 A C A T 阻害強度 IC_{50} が 460 nM (J 774) となり、A C A T 阻害活性が大幅に低下した。リード化合物である特願平 11-500471 号における実施例-85 の化合物のその値は 19 nM であるから、実に約 24 倍もの活性の低下になった。

しかし、水酸基の導入によりある程度の水溶性の改善がおこなえるので、この水酸基の導入に着目し、さらに検討した結果、意外にも当該フェニル基の 4 位に水酸基を導入した本発明の化合物が極度の活性の低下を招くことなく、優れた経口吸収性や薬物血中濃度を有することを見出した。

リード化合物の実施例-85 の化合物のアミド基に結合するフェニル基の 4 位に水酸基が導入された本発明の化合物である 2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミドの塩酸塩は、試験管内試験 (in vitro) の A C A T 阻害活性試験で IC_{50} (J 774) が 65 nM で、 IC_{50} (Hep G2) が 2900 nM であり、J 774 細胞における阻害強度をそれ程損なうことなく、選択性 (IC_{50} (Hep G2) / IC_{50} (J 774)) は 45 倍となり、リード化合物に比べてもより選択的な阻害活性を示した。この結果を先に示した比較化合物と併せて次の表 5 に示す。

表 5

試験化合物	J774 : IC ₅₀ (nM)	HepG2 : IC ₅₀ (nM)	比率 : HepG2 / J774
実施例 - 85	19	680	36
本発明化合物	65	2900	45
比較化合物	460	—	—

さらに、この本発明の化合物の日本薬局方 I 液における水溶性を検討したところ、水溶性はリード化合物の 0.1 mg/mL から 0.5 mg/mL と 5 倍の増大を示した。そして、ラットを用いた飽食下の経口吸収性試験（投与量 30 mg/kg）においては、投与媒体として水/PEG400（1:4）の場合では、C_{max}（薬物最大血中濃度）が 141 ng/mL、AUC が 486 ng·hr/mL を示した。この値は、特願平 11-500471 号の実施例 - 85 の化合物と比べ約 8 倍の経口吸収性が増大したことになる。また、投与媒体として 0.5% メチルセルロース（MC）懸濁液の場合では、C_{max} が 167 ng/mL、AUC が 639 ng·hr/mL となり、約 9.4 倍という大幅な経口吸収性の改善が見られた。これらの結果をまとめて次の表 6 に示す。

表 6

試験化合物	投与量	投与媒体	C _{max}	AUC _{0-inf}
実施例 - 85	30 mg/kg	PEG400	17.6 ng/mL	71.8 ng·hr/mL
本発明化合物	30 mg/kg	PEG400 : 水 4 : 1	141 ng/mL	486 ng·hr/mL
本発明化合物	30 mg/kg	0.5%MC 懸濁液	167 ng/mL	639 ng·hr/mL

この結果を踏まえて、さらに本発明の化合物について動脈硬化モデル動物試験を行った。動脈硬化モデル動物試験は、ロバートらの方法〔ロバート J. N. 等、Atherosclerosis 137, 77-85 (1998) 参照〕に準じ、F1Bハムスターを用いた脂質負荷モデルにおいて弓部大動脈の脂質沈着面積を測定し、薬剤の脂質沈着抑制効果を検討した。対照薬剤として特願平11-500471号における最も強力なACAT阻害活性を有する実施例-24の化合物及び先の文献に報告されている、N-[2-(2, 4, 6-トリイソプロピルフェニル)アセチル]スルファミン酸 2, 6-ジイソプロピルフェニルエステル(特表平8-510256号, WO94/26702号の例-5 (Example-5)の化合物。以下、CI-1011という。)を用いた。試験の結果を次の表7に示す。

表 7

試験化合物	投与量 mg/kg	CE/FC			
		大動脈 脂質沈着	肝臓	小腸	副腎
本発明 化合物	対照	1.0	1.0	1.0	1.0
	3	0.69	1.08	1.16	1.02
	10	0.33	0.88	1.02	1.11
	30	0.21	0.60	0.91	0.89
	100	0.17	0.24	0.20	0.52
試験化合物	投与量 mg/kg	CE/FC			
		大動脈 脂質沈着	肝臓	小腸	副腎
CI-1011	対照	1.0	1.0	1.0	1.0
	0.1	0.73	1.03	0.92	0.98
	0.3	0.81	0.74	0.82	1.03
	1	0.35	0.37	0.60	0.62
	3	0.15	0.17	0.08	0.24
	10	0	0.07	0	0.28
試験化合物	投与量 mg/kg	CE/FC			
		大動脈 脂質沈着	肝臓	小腸	副腎
実施例－ 24の 化合物	対照	1.0	1.0	1.0	1.0
	1	0.91	0.89	0.79	0.6
	3	0.37	0.36	0.45	0.34
	10	0.32	0.16	0.21	0.11
	30	0.28	0.09	0.13	0.11

表中の、CEはコレステロール・エステルを、FCは遊離コレステロールをそれぞれ示す。

また、これらの結果をグラフにしたものを第1図～第6図として示す。第1図は本発明の化合物の結果であり、第2図はC I - 1 0 1 1の結果であり、第3図は特願平11-500471号の実施例-24の化合物の結果である。第1図～第3図の縦軸は対照に対する相対比(%)であり、横軸は投与量(mg/kg)をそれぞれ示し、白抜き部分は脂質沈着面積を、黒塗り部分は血漿総コレステロールをそれぞれ示す。第1図～第3図中のアスタリスク(*又は**)は有意差があることを示している(*:P<0.05, **:P<0.01, Dunnett検定)。

また、第4図は本発明の化合物の結果であり、第5図はC I - 1 0 1 1の結果であり、第6図は特願平11-500471号の実施例-24の化合物の結果である。第4図～第6図の縦軸は対照に対する相対比(%)であり、横軸は投与量(mg/kg)をそれぞれ示し、白丸印(○)は大動脈脂質沈着比を、菱形印(◇)は血漿総コレステロールの対照に対する相対比を、黒四角印(■)は肝臓におけるコレステロール・エステル/遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比を、黒三角印(▲)は小腸におけるコレステロール・エステル/遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比を、バツ印(×)は副腎におけるコレステロール・エステル/遊離コレステロールの比率の対照に対する相対比をそれぞれ示す。

これらの相対比は次の式で示される。

$$\text{相対比(\%)} = (\text{投与 (CE/FC)}) / (\text{対照 (CE/FC)}) \times 100$$

これらの結果から、本発明の化合物は、血漿コレステロール(第1図～第3図の黒塗り部分、第4図～第6図の菱形印)の著しい低下を伴うことなく脂質沈着抑制(第1図～第3図の白抜き部分、第4図～第6図の白丸印)は投与量が3mg/kgより有効であった。一方、マクロファージ選択性(IC₅₀(HepG2)/IC₅₀(J774))が低い実施例-24の化合物及び対照薬剤(CI-1011)の脂質沈着抑制はそれぞれ3mg/kg、1mg/kgより有効であったが、いずれも血漿コレステロールの顕著な低下を伴っており、これは直接血管壁に作用が生じる好ましい結果ということではできなかった。

これらの結果、本発明の化合物が従来のA C A T阻害剤とは異なり、血中脂質の変動とは独立に血管壁のA C A Tを直接かつ選択的に阻害し、脂質沈着抑制を発揮したことが示された。

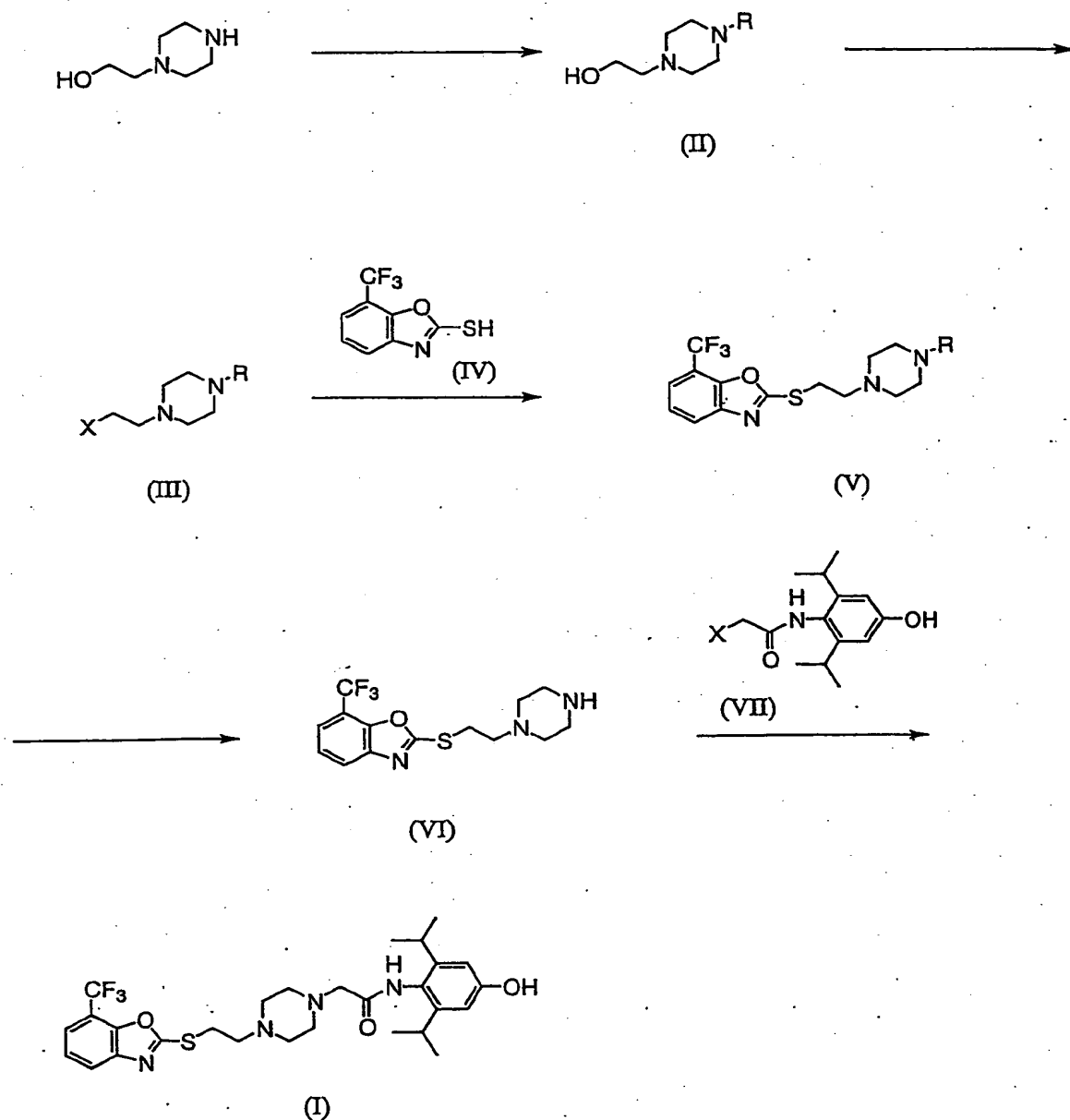
さらに、この生体内 (i n v i v o) 試験の結果は、先の試験管内 (i n v i t r o) 試験における細胞選択性を反映していることが、即ち、A C A T阻害剤が血管壁の組織に選択的に作用したことは各組織における脂質構成：コレステロール・エステル (C E) / 遊離コレステロール (F C) の比率を検討することにより判明することが示された。

また、本発明の化合物の投与量、特に10及び30mg/kgにおける肝臓、小腸、副腎のC E / F Cの比率と弓部大動脈脂質沈着の抑制率とは顕著な乖離を示し、肝臓で2.6-2.8倍、小腸で3.1-4.2倍、副腎で3.4-4.2倍程の組織選択性を示した。一方、対照薬剤 (C I - 1011) 及び実施例-24の化合物の投与における各組織では、殆ど連動し変化し顕著な乖離は見出せなかった。ここに従来のA C A T阻害剤、即ち、肝臓、小腸に作用し血中脂質を低下させ、ひいては抗動脈硬化作用に寄与するタイプとは異なり、本発明の化合物は血管壁への直接、選択的作用を有する新しいタイプのA C A T阻害剤であることが特徴づけられた。

即ち、本発明は、新しいタイプの血管壁に選択的なA C A T阻害剤を実現し、その完成に至った。本発明は優れたA C A T阻害活性を有する化合物を提供するものであり、特に選択的なA C A T阻害作用を示すことは副作用の少ない医薬組成物として動脈硬化症の治療剤として有用であり、医薬品としての適用範囲を広げるものである。

本発明の化合物の酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、及び、メタンスルホン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩等の有機酸塩などがあげられる。また、溶媒和物としては、製造時、精製時などに用いた溶媒、例えば、水、アルコールなどが付加したものであり、A C A T阻害作用などに悪影響を及ぼさないものであれば特に制限されるものではない。溶媒和物としては水和物が好ましい。

本発明の化合物は種々の公知の方法で製造することができ、特に制限されるものではなく、例えば、特願平 1 1 - 5 0 0 4 7 1 号に記載の方法に従って製造することができる。より具体的には、例えば次に示す方法により製造することができる。



(式中、Rは保護壁を、Xは脱離基を示す。)

(1) 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンの1位の窒素原子に保護基が結合した化合物(II)を、塩化メタンスルホニルなどを用いて末端の水酸基を活性化した化合物(III)とし、ついでこれに2-メルカプト-7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール(IV)を反応させて、対応する4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]-1-ピペラジンの1位保護基体(V)とする。

(2) 前記(1)で得られた1位保護基体(V)の1位の保護基を脱保護して1-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン又はその塩(VI)とする。

(3) 前記(2)で得られた化合物(VI)に2-ハロ-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド(VII)を反応させて、目的の2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド(I)を製造することができる。

化合物(II)における窒素原子の保護基としては、ペプチド合成などに使用される各種の保護基を使用することができる。好ましい保護基としてはベンジルオキシカルボニル基、2,2,2-トリクロロエチルオキシカルボニル基、2-トリメチルシリルエチルオキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基などのアルコキシカルボニル基などが挙げられる。

化合物(II)に、例えばメシル化、トシル化等のスルホニル化反応を行なうことにより化合物(III)が得られる。スルホニル化反応は通常の方法を利用できるが、例えば塩化メタンスルホニル、メタンスルホン酸無水物、メタンスルホニルフルオリド、ベンゼンスルホニルクロリド、p-トルエンスルホニルクロリドなどのスルホン酸エステル化剤を用いる方法が好ましい。この反応は溶媒中で塩基の存在下で行われる。溶媒としては、例えばテトラヒドロフラン(THF)、塩化メチレン、クロロホルムなどが挙げられ、塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、N,N-ジメチルアニリンなどの有機塩基を使用することができる。

化合物(III)と化合物(IV)の反応は溶媒中で塩基の存在下で行われる。

溶媒としては、例えば、アセトン、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミドなどが挙げられるが、中でもN, N-ジメチルホルムアミドが好ましい。塩基としては、例えば、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の水酸化アルカリ金属類、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸アルカリ金属類、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等の炭酸水素金属類などの無機塩基、ピリジン、トリエチルアミン、N, N-ジイソプロピルエチルアミンなどの有機塩基を使用することができるが、特に炭酸カリウムが好ましい。反応は20～150℃で、0.1～20時間、好ましくは、60～90℃で、1～5時間で反応を終了させることができる。

化合物(V)の脱保護の反応は、保護基に応じて公知の方法により行うことができる。

得られた化合物(VI)と化合物(VII)との反応は、前記(1)の工程に準じて行なうことができるが、化合物(VI)を酸付加塩としてから本反応を行なうことが好ましい。酸としては、例えば酢酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸を用いることが特に好ましい。

化合物(VII)における脱離基のハロゲンとしては、塩素原子、臭素原子などのハロゲン原子が挙げられる。

本発明の化合物は、ACAT阻害作用及び／又は細胞内コレステロール輸送阻害作用を有し、高脂血症治療剤又は動脈硬化治療剤などとして医療分野で有用である。特に、本発明の化合物は、血管壁に存在するタイプのACAT酵素を選択的に阻害する作用を示すことから、非選択的なACAT阻害剤に比べて副作用が少ないこと、更に水溶性を示すことから経口吸収の改善が期待され、医薬の有効成分として好ましい。

本発明の医薬組成物は、本発明の化合物、その酸付加塩又は溶媒和物を有効成分とするものであり、この有効成分を単独で又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、希釈剤などの担体からなるものである。本発明の医薬組成物は、ACAT阻害剤、細胞内コレステロール輸送阻害剤、血中コレステロール低下剤、又は、マクロファージ泡沫化抑制剤としての薬効を有するものである。すなわち、本発明の医薬組成物は、高脂血症、動脈硬化症、頸部及び脳動脈硬化症、脳血管障害、

虚血性心疾患、冠状動脈硬化症、腎硬化症、動脈硬化性腎硬化症、細動脈硬化性腎硬化症、悪性腎硬化症、虚血性腸疾患、急性腸管膜血管閉塞症、慢性腸管アンギーナ、虚血性大腸炎、大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症（A S O）などの疾患の治療、予防用の医薬組成物として有用である。

本発明の医薬組成物は、各種の薬学的に許容される担体を用いて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、粉末剤、注射剤、坐剤等に製剤化することができる。

これらの製剤は公知の方法で製造することができる。例えば経口投与用製剤とする場合には、本発明の化合物を澱粉、マンニトール、乳糖等の賦形剤：カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤：結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤：タルク、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤：軽質無水ケイ酸等の流動性向上剤などを適宜組み合わせて処方することにより製造することができる。

本発明の医薬組成物は、経口投与又は非経口投与により投与される。

本発明の医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、本発明の化合物として、通常成人の場合、1日1～1000mg、好ましくは5～200mgを1～3回に分けて投与するのが好ましい。

本発明の化合物のACAT阻害作用などは以下に示す実施例に記載の方法で試験した。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

J 7 7 4細胞およびH e p G 2細胞におけるACAT阻害活性試験の方法
(抗泡沫化作用)

J 7 7 4細胞またはH e p G 2細胞を24穴プレートに播種し、J 7 7 4細胞はDulbecco's modified Eagle's 培地、HepG2細胞はEagle's Minimum Essential 培地を用い（それぞれ10% 牛胎児血清を含む）を用い、37℃、5%CO₂イ

ンキュベーターにて24時間培養した。10 μ g/mLの25-ヒドロキシコレステロール及び検体を含む各培養液0.5 mLに交換後さらに18時間培養した。培地を除きPBSで2回洗浄後1.5 mLのヘキサン：イソプロパノール（3：2）で抽出し濃縮乾固した。抽出物を0.2 mLの10% Triton X-100を含むイソプロパノールに溶解し、総コレステロール（TC）及び遊離コレステロール（FC）をそれぞれコレステロールEテストワコー（和光純薬工業）、遊離コレステロールEテストワコー（和光純薬工業）で測定した。細胞の抽出残渣を0.25 mLの2N NaOHに37℃、30分で可溶化し、BCA Protein Assay Reagent (Pierce)で蛋白量を測定した。TCとFCの差から蛋白あたりのコレステロールエステル量を算出し、コントロールとの対比計算からIC₅₀値を求めた。

実施例 2

ラット経口吸収性の試験方法

飽食条件下のラット3匹に本発明の化合物の溶液（水：PEG400=1：4の混合液に溶解）あるいは0.5%メチルセルロース（MC）懸濁液として30 mg/kgで強制経口投与した。投与後の血液を経時的に採取し下記の方法で血漿中の濃度を測定した。また、同様に特願平11-500471号の実施例-85の化合物の溶液（PEG400に溶解）として30 mg/kgで強制経口投与し、血漿中濃度を測定した。

実施例 3

本発明化合物の血漿中濃度の測定方法

血漿150 μ Lに1 mol/Lグリシン緩衝液（pH8）及び内部標準物質として類縁化合物：特願平11-500471号の実施例-98の化合物：2-[4-[2-(4,5,6-トリメトキシベンゾチアゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピルフェニル)アセトアミド（500 ng/mL）0.2 mLを添加、攪拌後、イソプロパノール/n-ヘキサン（5：95）溶液6 mLで抽出した。有機層（上層）を分取後、窒

素気流下に溶媒を留去した後、残渣を移動相（下記参照）0.2 mLで溶解後、80 μ Lを以下の分析条件により測定した。

検出条件：（検出器；シングルステージ四重極型質量分析計、
イオン化法；大気圧化学イオン化法、
ネブライザー温度；475℃、
コロナ電圧；3 kV、
モニタリングイオン；m/z 565（本発明の化合物の水素付加イオン）、579（特願平11-500471号実施例-98の化合物の水素付加イオン））

分離条件：（カラム；GLサイエンス社製 Inertsil ODS 3 V
（3.0 mm ϕ \times 150 mm）、
カラム温度；45℃、
移動相；0.1%ギ酸アンモニウム（pH 4）／メタノール／アセトニトリルを7：3：10で混合した溶液、
流速；1.0 mL/min）

実施例 4

特願平11-500471号実施例-78の化合物の血漿中濃度の測定方法
血漿150 μ Lに0.1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液及び内部標準物質として類縁化合物特願平11-500471号の実施例-85の化合物：2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピルフェニル)アセトアミド（500 ng/mL）0.2 mLを添加、攪拌後、イソプロパノール／ヘキサン（5：95）溶液6 mLで抽出した。有機層を分取後、窒素気流下に溶媒を留去した後、残渣を移動相（下記参照）0.2 mLで溶解後、80 μ Lを以下の高速液体クロマトグラフィーの条件により測定した。

検出条件：（検出器；シングルステージ四重極型質量分析計、
イオン化法；大気圧化学イオン化法、
ネブライザー温度；475℃、

コロナ電圧；3 kV、

モニタリングイオン； m/z 569（実施例－78の化合物の水素付加イオン），549（実施例－85の化合物の水素付加イオン））

分離条件：（カラム；Waters社製Symmetry RP8
（3.0 mm ϕ \times 150 mm）、

カラム温度；45℃、

移動相；0.1%ギ酸アンモニウム（pH4）／メタノール／
アセトニトリルを7：3：10で混合した溶液、

流速；0.8 mL/min）

実施例 5

特願平11-500471号の実施例－85の化合物の血漿中濃度の測定方法
血漿150 μ Lに0.1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液及び内部標準物質
として類縁化合物：特願平8-158743号の実施例－28：8-（ベンズイ
ミダゾール－2-イルチオ）-N-（2,6-ジイソプロピルフェニル）オクタ
ンアミド（500 ng/mL）0.2 mLを添加、攪拌後、イソプロパノール／
ヘキサン（5：95）溶液6 mLで抽出した。有機層を分取後、窒素気流下に溶
媒を留去した後、残渣を移動相（下記参照）0.2 mLで溶解後、80 μ Lを以
下の高速液体クロマトグラフィー条件により測定した。

検出条件：（検出器；シングルステージ四重極型質量分析計、

イオン化法；大気圧化学イオン化法、

ネブライザー温度；475℃、

コロナ電圧；3 kV、

モニタリングイオン； m/z 549（実施例－85の水素付加イ
オン），452（実施例－28の水素付加イオン））

分離条件：（カラム；Waters社製Symmetry RP8
（3.0 mm ϕ \times 150 mm）、

カラム温度；45℃、

移動相； 0.1%ギ酸アンモニウム (pH 4) / メタノール / アセトニトリルを 7 : 3 : 10 で混合した溶液、
流速； 0.8 mL / min)

実施例 6

動脈硬化モデル動物の試験方法

ロバートらの方法に準じ、動脈硬化モデル動物実験：F₁Bハムスターを用いた脂質負荷モデルにおいて弓部大動脈の脂質沈着面積を測定し、本発明化合物の脂質沈着抑制効果を検討した [ロバート J. N. 等、Atherosclerosis 137, 77-85 (1998) 参照]。対照薬剤は、特願平 11-500471 における最も強力な ACAT 阻害活性を有する実施例-24 の化合物および先の文献に報告されている CI-1011 : N-[2-(2, 4, 6-トリイソプロピルフェニル) アセチル] スルファミン酸 2, 6-ジイソプロピルフェニルエステル (特表平 8-510256, WO 94/26702, 例-5) を用いた。

日本チャールスリバー (株) より入手した B₁o F₁B 系雄性ハムスターに各群 6 匹となるようにランダムに割り当て群分けを行った。8 週齢より高脂肪食 (0.3% コレステロール、10% ココナツ油) を 10 週間負荷し、薬物は混餌で投与した。10 週後、採血を行い、血漿コレステロールを測定した。さらに大動脈を 10% ホルマリン液にて灌流固定後摘出した。これを切開し、オイルレッド O (Oil Red O) を用いて大動脈に沈着した脂質を染色し、その染色面積は画像解析装置を用い計測した。

薬物調製および投与方法

高脂肪食 (0.3% コレステロール、10% ココナツ油) は、コレステロール : ココナツ油 : 飼料 (CE-2) = 0.03 : 1 : 9 の配合比で調製した。なお、対照群には、高脂肪食を与え投与期間は 10 週間とした。投与量の設定は、予備検討より 100 mg / kg 投与を上限とし、血漿総コレステロールの低下が認められない用量より公比 3 とし、4 用量とした。

群構成

対照群 (高脂肪食)

(n = 6)

本発明化合物 : 3, 10, 30, 100 mg/kg 投与群 (各群 n = 6)

実施例 - 24 の化合物 : 1, 3, 10, 30 mg/kg 投与群 (各群 n = 6)

CI-1011 : 0.3, 1, 3, 10 mg/kg 投与群 (各群 n = 6)

観察および検査方法

血中および組織中 (肝臓、小腸、副腎) 脂質濃度

非絶食下のハムスターを麻酔し開腹して腹部大静脈を露出させ、約 2.5 mL を採血した。採取した血液を 3000 rpm で 15 分遠心して血漿を分取し、血漿総コレステロール (TC) はコレステロール E-テストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法)、遊離コレステロール (FC) は遊離コレステロール E-テストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法) を用いてそれぞれ測定した。

約 500 mg の肝臓と小腸、および副腎を摘出し生理食塩液で洗浄後、組織中脂質濃度を測定した。測定に際しては、肝臓および小腸に組織中脂質抽出液として 10 mL のクロロホルム : メタノール = 2 : 1 を入れてポリトロンホモジナイザー PT3100 を用い 3000 rpm でホモジェナイズし、4℃で一晩静置した。抽出液を 1500 rpm で 15 分間遠心分離し、上清の 0.2 mL を真空ポンプで蒸発乾固した後、イソプロパノール 50 μ L で溶解して、各脂質を同様のキットにより TC、FC を定量した。副腎は、はさみで細切した後、0.5 mL のクロロホルム : メタノール = 2 : 1 を入れ、4℃で一晩静置した。これを 1500 rpm で 15 分間遠心分離し、上清 0.2 mL を分取して真空ポンプで蒸発乾固した後、イソプロパノール 50 μ L で溶解して TC および FC をキットにより定量した。

薬剤投与群の血漿総コレステロール (TC) は対照群の TC に対する相対比を指標とし、臓器は TC と FC の差を CE (コレステロールエステル) とし各臓器における脂質構成比 : CE/FC の比率を求め、それらを各対照に対する相対比を算出し指標とした。即ち、これらの指標は対照群を 100% とし、薬剤投与群

の肝臓、小腸に対するA C A T阻害作用による血漿T C低下作用を指標に、また、各臓器に対するA C A T阻害作用によるC E / F C比の変動を指標にするため、以下の式で算出した。

血漿総コレステロールの指標 (%)

$$= (\text{薬剤投与群のT C} / \text{対照群のT C}) \times 100$$

各臓器における脂質構成比の指標 (%)

$$= (\text{薬剤投与群のC E} / \text{F C} / \text{対照群のC E} / \text{F C}) \times 100$$

大動脈における脂質沈着面積

採血終了後、心尖部に1.8-G注射針を刺し、生理食塩液(120 mmHg)で約5分間灌流した。さらに、10%中性ホルマリン緩衝液(120 mmHg)で約5分間灌流した。弓部および胸部大動脈を摘出して、10%ホルマリン緩衝液中で固定した。固定後、大動脈の小彎と一部の大彎を切開して、オイルレッドO(Oil red O)染色を行った。これをゴム板上に開いて張り付け、オイルレッドO(Oil red O)染色部の面積および内腔表面の面積をオリンパス画像解析装置により測定した。各群の各例でオイルレッドO(Oil red O)染色部の面積を内腔表面の面積に対する比を求め、これを大動脈脂質沈着率とした。大動脈脂質沈着抑制率は、薬剤投与群の大動脈脂質沈着率を対照群の大動脈脂質沈着率に対する比を求め、これをA C A T阻害作用による大動脈沈着抑制率の指標とした。

以下の式で指標を算出した。

大動脈脂質沈着率 (%)

$$= [\text{オイルレッドO(Oil red O)染色部の面積}] / (\text{内腔表面の面積}) \times 100$$

大動脈脂質沈着抑制率 (%)

$$= (\text{各群の大動脈脂質沈着率}) / (\text{対照群の大動脈脂質沈着率}) \times 100$$

実施例7

製造実施例

tert-ブチル 4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]-1-ピペラジンカルボキシラートの製造:

tert-ブチル 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンカルボキシレート (30.00 g, 0.130 mol) の THF (200 mL) 溶液にトリエチルアミン (17.14 g, 0.169 mol) および 4-ジメチルアミノピリジン (1.59 g, 13.0 mmol) を加え、氷冷下、塩化メタンスルホン (17.91 g, 0.156 mol) の THF (100 mL) 溶液を滴下し、30 分間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣を DMF (300 mL) に溶解し、特願平 11-500471 号の実施例-85 に記載の方法で得られる 2-メルカプト-7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール (28.55 g, 0.130 mol)、18-クラウン-6 (1.72 g, 6.51 mmol) および炭酸カリウム (21.60 g, 0.156 mol) の DMF (500 mL) 溶液中に 80 °C で滴下し、同温で 30 分間攪拌した。反応液を減圧濃縮し得られた残渣を水および酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 600 g, 展開溶媒ヘキサン/アセトン=5/1) を用いて精製し、目的化合物 39.82 g (収率 71%) を淡褐色油状物として得た。

IR (neat) cm^{-1} : 2977, 1699, 1506, 1493, 1432.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ :

1.46 (9H, s), 2.49 (4H, t, $J=4.9$ Hz), 2.83 (2H, t, $J=6.8$ Hz),
3.43 (4H, t, $J=4.9$ Hz), 3.49 (2H, t, $J=6.8$ Hz),
7.37 (1H, t, $J=8.1$ Hz), 7.47 (1H, d, $J=8.1$ Hz),
7.75 (1H, d, $J=8.1$ Hz).

元素分析: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ として

計算値: C, 52.89; H, 5.61; N, 9.74; F, 13.21.

実測値: C, 53.07; H, 5.69; N, 9.76; F, 13.11.

実施例 8

1-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン・2トリフルオロ酢酸塩の製造:

tert-ブチル 4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]-1-ピペラジincarボキシラート (37.92 g, 87.9 mmol) を氷冷下トリフルオロ酢酸 (200 mL) に溶解し、同温で15分間攪拌した。氷冷下反応液にエーテルを加えて析出した結晶を濾取し、エーテル洗浄の後、減圧乾燥し、目的化合物 47.46 g (収率 97%) を微黄色粉末晶として得た。

融点: 155-156°C

IR (KBr) cm^{-1} : 3026, 2421, 1683, 1511, 1596.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO) δ :

2.75-2.90 (4H, m), 2.91-3.04 (2H, m), 3.05-3.22 (4H, m),

3.56 (2H, t, $J=6.8$ Hz), 7.54 (1H, t, $J=8.0$ Hz),

7.67 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 7.96 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 8.70 (1H, br s).

元素分析: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_9\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ として

計算値: C, 38.65; H, 3.24; N, 7.51.

実測値: C, 38.60; H, 3.25; N, 7.51.

実施例 9

2-ブロモ-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミドの製造:

4-アミノ-3,5-ジイソプロピルフェノール (特願平11-500471号の実施例-72に記載された方法により合成) (8.77 g, 45.4 mmol) の塩化メチレン (100 mL) 溶液に氷冷攪拌下、N,N-ジメチルアニリン (6.60 g, 54.5 mmol) の塩化メチレン (100 mL) 溶液を滴下した。引き続きプロモアセチルブロミド (10.1 g, 49.9 mmol) の塩化メチレン (75 mL) 溶液をゆっくりと滴下し、室温で30分間攪拌した。反応液が約100 mLになるまで溶媒を留去し、水 (100 mL) および飽和重曹

水 (100 mL) を加えて約 2 時間氷冷した。析出した結晶を濾取し、1 N 塩酸で洗浄した。得られた結晶をクロロホルム (100 mL) およびメタノール (25 mL) に溶解し、1 N 塩酸で 3 回洗浄した。さらに有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して目的化合物 12. 28 g (収率 86%) を褐色針状晶として得た。

融点: 196 – 197 °C

IR (KBr) cm^{-1} : 3288, 2966, 1665, 1593, 1534.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ :

1.18 (12H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 2.98 (2H, sept, $J=6.8\text{Hz}$), 4.08 (2H, s), 6.64 (2H, s), 7.57 (1H, br s).

ESI MS m/z (相対強度): 315 (M^++1), 313 (M^+-1),
220 (100).

元素分析: $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{BrNO}_2$ として

計算値: C, 53.51; H, 6.42; N, 4.46.

実測値: C, 53.50; H, 6.33; N, 4.28.

実施例 10

2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド・塩酸塩の製造: (本発明の化合物)

1-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン・2トリフルオロ酢酸塩 (40.00 g, 71.5 mmol) のアセトニトリル懸濁液 (1 L) に室温で炭酸水素ナトリウム (24.03 g, 0.286 mol) を加え、同温で 1 時間攪拌した。氷冷下反応液に 2-ブロモ-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド (22.47 g, 71.5 mmol) および炭酸カリウム (14.82 g, 0.107 mol) を順次加え、室温で 20 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し得られた残渣を水およびクロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロ

マトグラフィー（シリカゲル400g, 展開溶媒 ヘキサン/アセトン=2/1 → 1/1）を用いて精製し、アセトン-ヘキサンから再結晶し、遊離体の2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)アセトアミド39.37g（収率98%）を微黄色粉末晶として得た。

この遊離体のアミド（34.71g, 61.5mmol）のメタノール溶液（150mL）に氷冷下、4N塩化水素酢酸エチル溶液（16.9mL, 67.6mmol）を滴下し、同温で10分間攪拌した。反応液に同温にてエーテルを加えて析出した結晶を濾取し、エーテルで洗浄の後、減圧乾燥し、目的化合物34.35g（収率93%）を無色粉末晶として得た。

融点：258-259℃

IR (KBr) cm^{-1} : 3440, 2967, 1661, 1609, 1594.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 120℃) δ :

1.12 (12H, d, $J=6.8$ Hz), 2.97 (2H, sept, $J=6.8$ Hz),
3.05-3.24 (10H, m), 3.66 (2H, t, $J=6.8$ Hz), 3.78 (2H, s),
6.57 (2H, s), 7.54 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 7.63 (1H, d, $J=7.8$ Hz),
7.92 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 9.10 (1H, br s).

元素分析: $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ として

計算値: C, 55.95; H, 6.04; N, 9.32; Cl, 5.90;
F, 9.48.

実測値: C, 55.80; H, 6.01; N, 9.23; Cl, 5.92;
F, 9.31.

実施例 11

2-[4-[2-(7-トリフルオロメチルベンゾオキサゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-(2,6-ジイソプロピル-3-ヒドロキシフェニル)アセトアミドの製造: (比較化合物)

特願平11-500471号の実施例-87で得られた2-[4-[2-(7

—トリフルオロメチルベンゾオキサゾール—2—イルチオ)エチル]ピペラジン—1—イル]—N—(2,6—ジイソプロピル—3—ニトロフェニル)アセトアミドを、同特許明細書の実施例—59に記載の方法に準じ、還元し得られた2—[4—[2—(7—トリフルオロメチルベンゾオキサゾール—2—イルチオ)エチル]ピペラジン—1—イル]—N—(3—アミノ—2,6—ジイソプロピルフェニル)アセトアミドを得た。これを同特許明細書の実施例—61に記載の方法と同様に反応させて、処理し、目的化合物を無色結晶として得た。

融点：82—84℃

IR (KBr) cm^{-1} : 3314, 1667, 1595, 1505,
1330.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ :

1.16 (6H, d, $J=6.8$ Hz), 1.34 (6H, d, $J=6.8$ Hz),
2.60—2.77 (8H, m), 2.85 (2H, t, $J=6.8$ Hz),
2.89 (1H, sept, $J=6.8$ Hz), 3.14 (1H, sept, $J=6.8$ Hz),
3.20 (2H, s), 3.50 (2H, t, $J=6.8$ Hz), 5.82 (1H, br s),
6.65 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 6.99 (1H, d, $J=8.5$ Hz),
7.34 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 7.47 (1H, d, $J=7.8$ Hz),
7.75 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 8.58 (1H, br s).

EMS m/z (relative intensity): 564 (M^+), 346 (100).

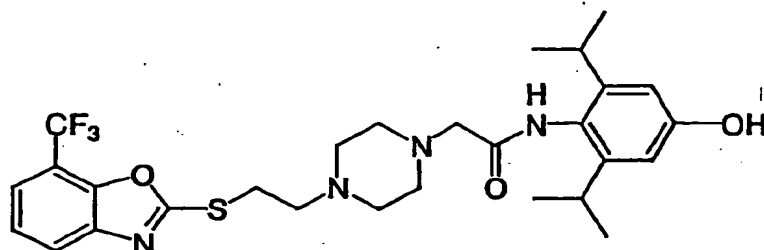
産業上の利用可能性

本発明は、実際の医薬品としてACAT阻害活性及びマクロファージ選択性を維持し、かつ、経口吸収性が優れた新規な化合物、及びそれを用いた医薬組成物、並びにその中間体を提供するものである。

本発明の化合物は、経口吸収性が優れ高い血中濃度を保持することができると同時に、ACAT阻害剤として血管壁選択的に極めて優れた作用効果を有し、医薬品の有効成分として極めて選択性に優れた物質である。

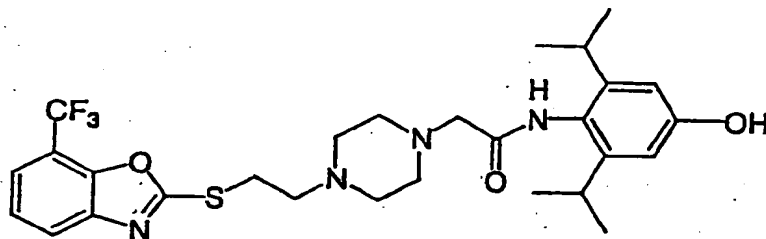
請 求 の 範 囲

1. 次式



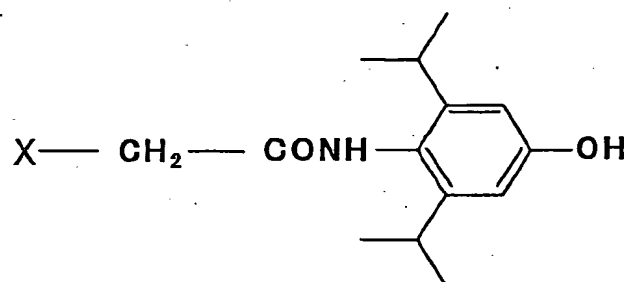
で表される 2 - [4 - [2 - (7 - トリフルオロメチルベンゾオキサゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - (2 , 6 - ジイソプロピル - 4 - ヒドロキシフェニル) アセトアミド、この塩又はこの溶媒和物。

2. 次式



で表される化合物、この塩又はこの溶媒和物、及び薬学的に許容される担体とからなる A C A T 阻害作用を有する医薬組成物。

3 / 次式、

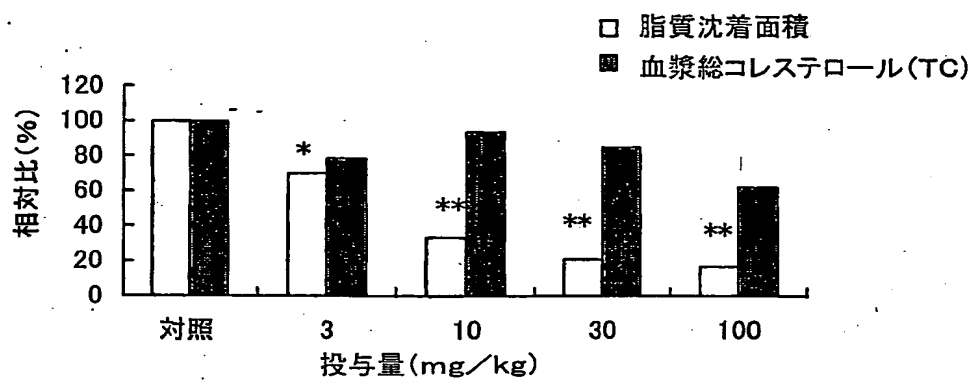


(式中、Xはハロゲン原子を示す。)

で表される化合物又はその塩。

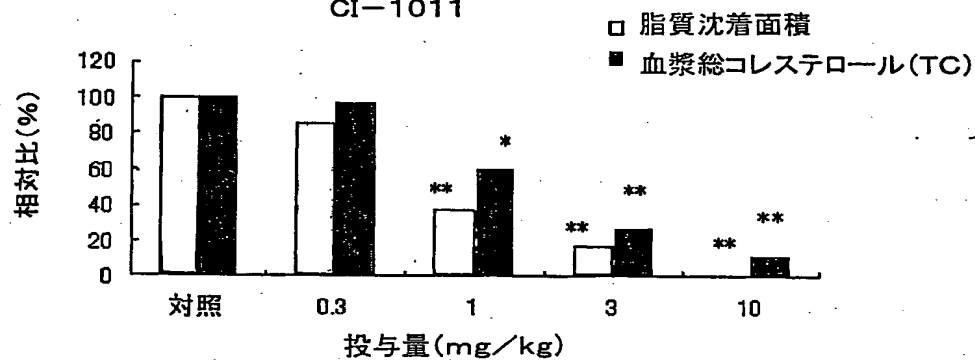
第 1 図

本発明化合物



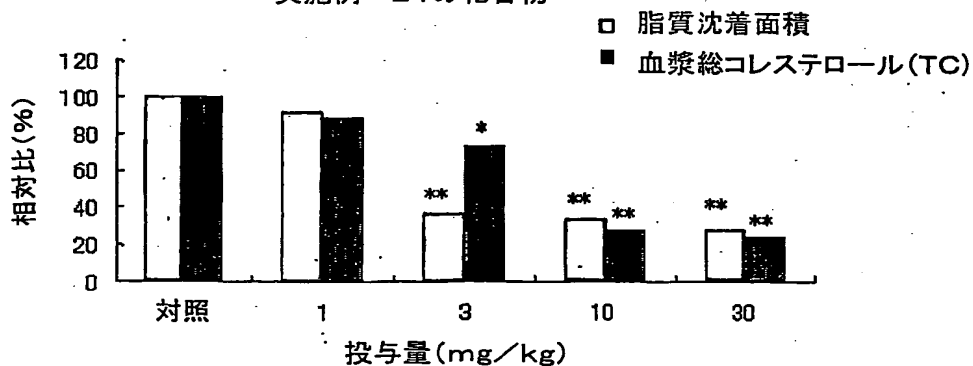
第 2 図

CI-1011



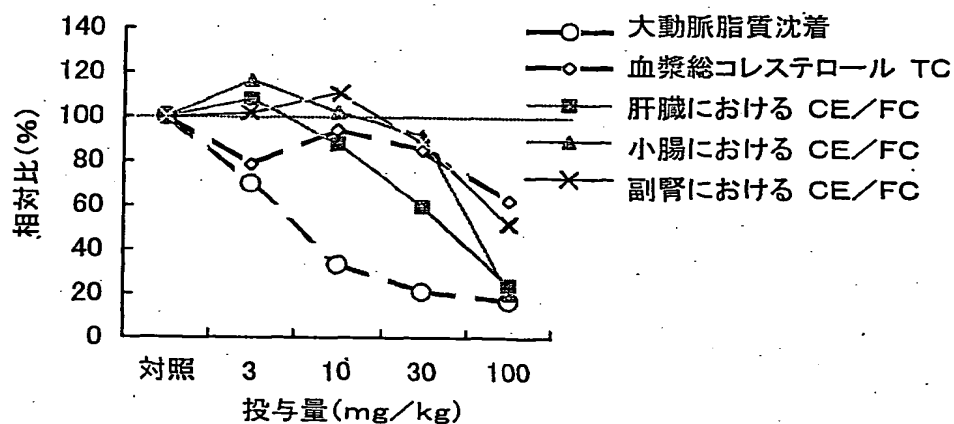
第 3 図

実施例-24の化合物



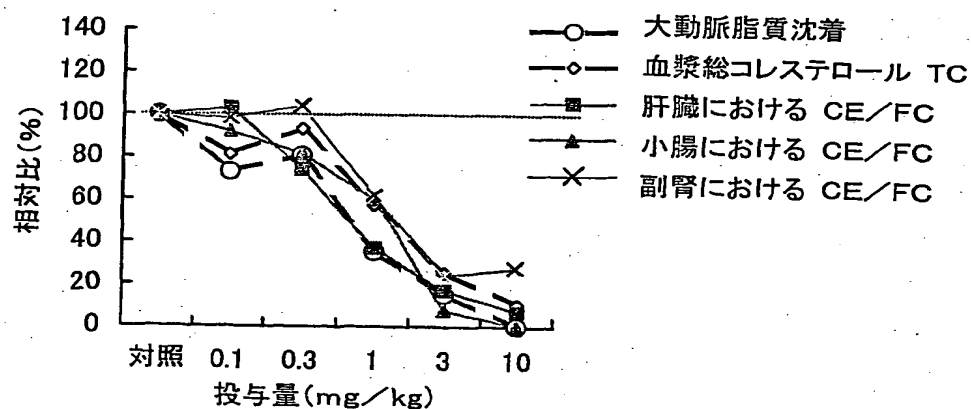
第 4 図

本発明化合物



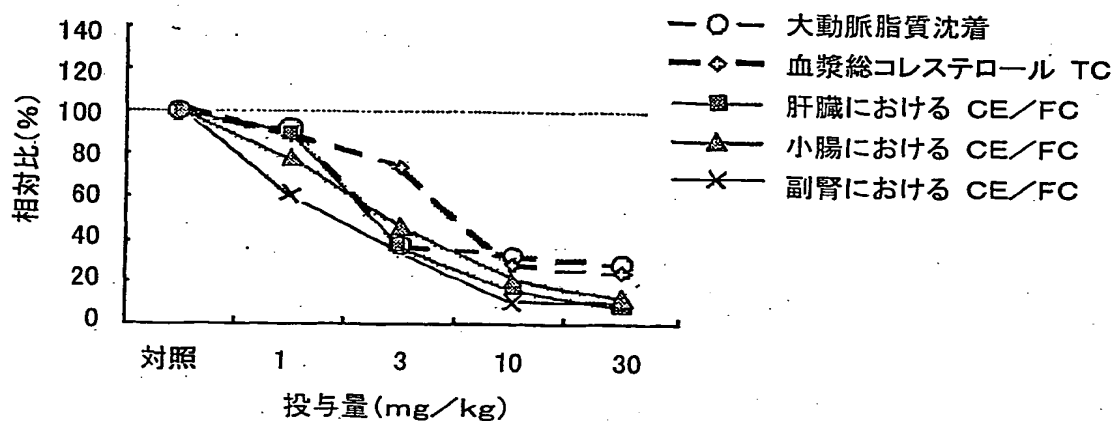
第 5 図

CI-1011



第 6 図

実施例-24の化合物



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C07D263/58, A61K31/496, A61P3/06, 9/10, 43/00, C07C233/25

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07D263/58, A61K31/496, A61P3/06, 9/10, 43/00, C07C233/25

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1992-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 987254 A1 (Kowa Co., Ltd.), 22 March, 2000 (22.03.00), Claims; examples 48, 69, 72, 85 & WO 98/54153 A1	1-3
X	EP 807627 A2 (Kowa Co., Ltd.), 19 November, 1997 (19.11.97), Full text JP 10-29986 A & US 6204278 B1	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
09 October, 2002 (09.10.02)

Date of mailing of the international search report
29 October, 2002 (29.10.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/08343

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D263/58, A61K31/496, A61P3/06, 9/10, 43/00, C07C233/25

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D263/58, A61K31/496, A61P3/06, 9/10, 43/00, C07C233/25

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1992-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2002年
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 987254 A1 (Kowa Co., Ltd) 2000.03.22, Claims, Example 48, 69, 72, 85 & WO 98/54153 A1	1-3
A	EP 807627 A2 (KOWA COMPANY LTD.) 1997.11.19, 全文 & JP 10-29986 A & US 6204278 B1	1-3

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.10.02

国際調査報告の発送日

29.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司



4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3451